

# On the Enzyme which Catalyzes a Synergistic Decarboxylation of Glyoxylate and -Ketoglutarate

著者	斎藤 毅
号	629
発行年	1970
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/18734">http://hdl.handle.net/10097/18734</a>

氏 名 ( 本 籍 )                      さい                      とり                      つよし  
斎                      藤                      毅

学 位 の 種 類                      医                      学                      博                      士

学 位 記 番 号                      医   博   第   6 2 9   号

学位授与年月日                      昭 和 4 5 年 3 月 2 5 日

学位授与の要件                      学位規則第 5 条第 1 項該当

研究科専門課程                      東北大学大学院医学研究科  
( 博士課程 ) 内科学系専攻

学位論文題目                       $\alpha$  - ケトグルタル酸とグリオキシル酸の協同  
的脱炭酸反応を触媒する酵素の本態に関する  
研究  
(On the Enzyme which Catalyzes a  
Synergistic Decarboxylation of Gly-  
oxylate and  $\alpha$ -Ketoglutarate)

( 主 査 )

論文審査委員   教授   鳥   飼   龍   生   教授   菊   地   吾   郎  
教授   吉   沢   善   作

## 論 文 内 容 要 旨

$\alpha$ -ケトグルタル酸 ( $\alpha$ -Kg) とグリオキシル酸 (GOX) の協同的脱炭酸反応は動物細胞及び種々の菌に広く存在していることが報告されている。その反応はまず  $\alpha$ -Kg と GOX が酵素的に縮合し、その際  $\alpha$ -Kg の 1-カルボキシル基が脱炭酸され 2-hydroxy-3-ketoadipic acid となり、ついでこの生成物は非酵素的に GOX 由来のカルボキシル基を失い 5-hydroxy-levulinic acid となると考えられるものである。この反応は一種のカルボリガーゼ反応であるが、反応生成物に関してはなお議論の余地があった。この反応を触媒する酵素は細菌からも、また動物からも部分的に精製されているが、その酵素の本態については検討すべき多くの点があった。私はこのカルボリガーゼ反応を触媒する酵素をかなり高度に精製してみた所、光合成菌 *Rhodopseudomonas spheroides* から精製したもの、ラット肝臓、またはブタ心筋より精製したものともに  $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素系中の  $\alpha$ -ケトグルタル酸脱炭酸酵素と同一のものであると考えられる成績を得た。

光合成菌 *R. spheroides* を音波破壊により粗抽出液を調製し、これを硫酸で分画した後、DEAE-cellulose によるカラムクロマトグラフィーを行ってさらに分画するとかなり高度の精製標品が得られた。この場合、カルボリガーゼの活性と、 $\alpha$ -Kg 脱炭酸酵素の活性は全く分離せず常に両者の活性の比はほぼ等しかった。特に DEAE-cellulose によって分画した場合、カルボリガーゼの活性の溶出パターンと脱炭酸酵素活性の溶出パターンはよく一致し、再クロマトを行っても全く分離することはなかった。

また一方、ラット肝のミトコンドリアからアセトンパウダーを調製して、このアセトンパウダーより 0.05 M 磷酸緩衝液によって酵素を抽出し、さらに硫酸分画、それに続く DEAE-cellulose によるカラムクロマトグラフィーを行って分画してみた所、やはり全製過程に於けるカルボリガーゼ活性と  $\alpha$ -Kg 脱炭酸酵素の活性の比はほぼ等しく、DEAE-cellulose によるクロマトグラフィーによっても全く両者は分離しなかった。以上の結果は  $\alpha$ -Kg 脱炭酸酵素が  $\alpha$ -Kg-GOX カルボリガーゼ反応も触媒すると推定するのに十分な成績である。

$\alpha$ -Kg 脱炭酸酵素の由来を追究する為に、豚の心筋より Sanadi 等の方法に従って  $\alpha$ -Kg 脱水素酵素複合体を調製し、カルボリガーゼ活性を測定してみた。この酵素複合体標品は  $\alpha$ -Kg, Coenzyme A, TPP 存在下で NAD を還元し、充分  $\alpha$ -Kg 脱水素酵素複合体としての活性を持っている。またこの複合体標品は Ferricyanide を電子受容体とすれば Coenzyme A, NAD なしに  $\alpha$ -Kg より活発に脱炭酸反応を触媒するものであるが、 $\alpha$ -Kg からの脱炭酸の活性は GOX

を添加すると Ferricyanide を電子受容体とした場合のほぼ 2 倍であり、またその際 G O X より脱炭酸も  $\alpha$ -K<sub>g</sub> からの脱炭酸量とストイキオメトリカルに行われることから強いカルボリガーゼ活性が存在することがわかった。またさらにこの酵素複合体を底糖濃度勾配を用いた超遠心を行うことによってさらに精製してみてもカルボリガーゼ活性と  $\alpha$ -K<sub>g</sub> 脱水素酵素系の活性の分離はみられなかった。従って少なくともこの酵素標品中にはカルボリガーゼ反応を触媒する酵素が存在することが確認された。もし  $\alpha$ -K<sub>g</sub> 脱水素酵素系中の脱炭酸酵素がカルボリガーゼ反応を触媒するとすれば、この酵素標品による  $\alpha$ -K<sub>g</sub>, Coenzyme A, T P P に依存する N A D の還元は G O X の添加により強く阻害されることが推定される。そこで N A D の還元に対する G O X の影響をしらべてみると、N A D の還元は強く G O X の添加によって阻害され、アセトアルデヒドも同程度の阻害をすることがわかった。この様な成績は  $\alpha$ -K<sub>g</sub> 脱水素酵素複合体中の  $\alpha$ -K<sub>g</sub> 脱炭酸酵素がカルボリガーゼ反応を触媒することを強く支持するものであるが、さらにこの点を確かめる為に複合体を 2.5 M の尿素で処理することにより複合体を構成する酵素を解離した後、磷酸カルシウムで分画後、D E A E-cellulose で脱炭酸酵素を精製してみた。この様にして分離精製した  $\alpha$ -K<sub>g</sub> 脱炭酸酵素も強いカルボリガーゼ活性を示し、D E A E-cellulose のカラムクロットグラフィー上でも脱炭酸酵素の活性とカルボリガーゼの活性は全く一致しており分離することはなかった。以上の様な結果から  $\alpha$ -K<sub>g</sub> 脱水素酵素複合体中の  $\alpha$ -K<sub>g</sub> 脱炭酸酵素そのものがカルボリガーゼ反応を触媒すると考えてさしつかえないと考えられる。

$\alpha$ -K<sub>g</sub>-G O X カルボリガーゼ反応の反応機構を推定する為に、 $\alpha$ -K<sub>g</sub>-1-<sup>14</sup>C を一つの基質として他の一つの基質に G O X の代りにフォルムアルデヒド、アセトアルデヒド、サクシニックスセミアルデヒドをそれぞれ用いてみた。 $\alpha$ -K<sub>g</sub>-1-<sup>14</sup>C より <sup>14</sup>C O<sub>2</sub> の生成量はこれらのアルデヒドの添加により  $\alpha$ -K<sub>g</sub>-1-<sup>14</sup>C 単独の場合よりいずれも増大した。しかし添加アルデヒドとして G O X を用いた場合より少かった。G O X を一つの基質とした場合サクシニックスセミアルデヒドは  $\alpha$ -K<sub>g</sub> には代り得なかった。この様な事からカルボリガーゼ反応の反応機構としてはビルビン酸脱水素酵素系によるビルビン酸からのアセチン生成と類似のものと推定される。すなわち、まず  $\alpha$ -K<sub>g</sub> は脱炭酸されると同時に、酵素上のチアミンピロ磷酸 (T P P) と縮合体を作る。この場合 G O X の様な受容体があればサクシニックスセミアルデヒドとして酵素 T P P 複合体から離れるがその反応速度は非常に小さいものと考えられる。G O X の様な受容体が存在する場合は受容体と縮合してヒドロキシケト酸となるが、この場合の反応速度は非常に大きいものと考えられる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

$\alpha$ -ケトグルタル酸 ( $\alpha$ -Kg) とグリオキシル酸 (GOX) の協同的脱炭酸を触媒する酵素が動物細胞および細菌に存在することが知られており、この反応は一種のカルボリガーゼ反応と理解されている。しかし本反応を触媒する酵素の本体については不明の点が多かつた。著者はこの点に着目して本酵素を特にラット肝ミトコンドリア、ブタ心筋より調製し、その性質を検討した結果、本反応を触媒する酵素は $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素系を構成する $\alpha$ -Kg 脱炭酸酵素と全く同一の酵素にほかならないことを明らかにした。

ラット肝酵素の場合にはそのミトコンドリアのアセトン粉末から抽出した粗酵素液を硫酸分画、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによつて分画したが、全精製過程を通じてカルボリガーゼ活性と $\alpha$ -Kg 脱炭酸酵素活性は平行し、その活性比は常に一定値を示した。

上のことから、カルボリガーゼ活性を示す酵素は $\alpha$ -Kg 脱炭酸酵素そのものか、あるいはそれに極めて近似のものである可能性が推察されたので、これをさらに追究するために、次にブタ心筋からSanadiの方法で $\alpha$ -Kg脱水素酵素複合体を調製し、そのカルボリガーゼ活性を検討した。この標品は $\alpha$ -Kg, Coenzyme A, TPPの共存下にNADを還元し、複合酵素系としての機能を完全に具えたものであつたが、これにGOXを加えると明らかに強いカルボリガーゼ活性を示した。この複合酵素系をさらに蔗糖密度勾配を用いた超速心法によつて精製したが、カルボリガーゼ活性と $\alpha$ -Kg脱水素酵素活性とは分離せず、さらに $\alpha$ -Kg脱水素反応はこれにGOXを添加すると強く阻害されることが知られた。これは $\alpha$ -Kg脱水素反応とカルボリガーゼ反応とが同一酵素によつて行われていることを示している。これを実体的に証明するために $\alpha$ -Kg脱水素酵素を尿素によつて解裂し、それに含まれる $\alpha$ -Kg脱炭酸酵素を分離し、脱炭酸活性とカルボリガーゼ活性との比較を行つたが、この時にも精製全過程を通じて両酵素活性は一定の比率を保持しながら平行した。

以上のことから、 $\alpha$ -KgとGOXとの協同的代謝を行うものは $\alpha$ -Kg脱炭酸酵素そのものにほかならないことが結論されたが、著者はさらにカルボリガーゼ反応の性格を明らかにする目的でGOXの代りにフオルムアルデヒド・アセトアルデヒド・コハク酸セミアルデヒドなどを用いて比較検討したが、GOXが最も強力な効果を示すことが示された。

本研究はこのように、従来不明であつたカルボリガーゼの実体を明らかにし、また $\alpha$ -Kg脱炭酸酵素が持つ新たな生理機能を明らかにしたものである。

よつて本論文は学位授与に値するものと認める。